

氏 名	のがみ かがやき 野上 暁生
学 位 の 種 類	博士（薬学）
学 位 記 番 号	富医薬博甲第 275 号
学位授与年月日	平成 30 年 3 月 23 日
学位授与の要件	富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当
教 育 部 名	富山大学大学院医学薬学教育部 博士期課程 薬学専攻
学 位 論 文 題 目	タンパク間相互作用を制御する架橋ヘリカルペプチド の開発とその酵素耐性向上
論文審査委員	
（主査）	教 授 中野 実
（副査）	教 授 友廣 岳則
（副査）	教 授 井上 将彦 （指導教員）

論文内容の要旨

タンパク-タンパク間相互作用 (Protein-Protein Interaction: PPI) では、その相互作用部位に存在する α -ヘリックス構造が重要な役割を担っている。したがって安定な α -ヘリックス構造をとるペプチド (ヘリカルペプチド) は、PPI を制御できる可能性がある。しかしタンパク中の α -ヘリックス部分の配列を基にペプチドを合成しても、タンパクという“土台”を失ったペプチドは期待した高次構造をとらない。

申請者の所属する研究室では、ペプチドの側鎖をクロスリンク剤で架橋し、ヘリックス構造を安定化する手法を確立している (図 1)。申請者はこの手法を用いて、アポトーシス関連タンパクの配列を基に架橋ヘリカルペプチドを構築した。そしてこのペプチドは、オリジナルのタンパクと同様に細胞のアポトーシスを誘導することが分かった。さらに、この開発した架橋ヘリカルペプチドに D アミノ酸を導入することでペプチドの酵素耐性を向上させることにも成功した。

1. Bad と Bcl-X_L 間の相互作用を阻害する架橋ヘリカルペプチドの開発¹⁾

Bcl-X_L はミトコンドリアに局在する抗アポトーシスタンパクであり、様々ながんで過剰発現することが知られている。Bcl-X_L と同じ Bcl ファミリーのタンパク Bad が Bcl-X_L と相互作用するとその機能が阻害され、細胞のアポトーシスが誘導される。したがって、Bad の機能を架橋ヘリカルペプチドで再現することができれば、細胞のアポトーシスを制御できると考えた。

本研究では、Bad の Bcl-X_L との相互作用部位の配列をそのまま抽出したペプチド **1** を基にヘリカルペプチドの構築を試みた。Bad と Bcl-X_L 複合体の構造データから相互作用に重要でないアミノ酸を選び、架橋用のオルニチン (Orn) を導入した。そしてその側鎖間を様々なクロスリンク剤で架橋したペプチドを合成し、CD スペクトルを測定してその高次構造を評価した。その結果、イソフタル酸クロスリンク剤で架橋したペプチド **2^{^i}** (“^{^i}” はイソフタル酸での架橋を意味する) が安定な α -ヘリックス構造をとることを見出した (表 1、図 2)。以後、ペプチド **1** および **2^{^i}**、架橋を施していないペプチド **2**、相互作用に重要なアミノ酸残基を **1** 残基変異させ同様に架橋した **3^{^i}** について比較評価を行った。

側鎖を蛍光分子 TokyoGreen (TG) で修飾したペプチド (ペプチド名の接尾に“-TG”をつけて表す) を用いて、Bcl-X_L との相互作用を定量的に評価した。解離定数 K_d は表 1 に示した結果となり、**2^{^i}-TG** は最も強く Bcl-X_L と相互作用した。

各ペプチドの酵素耐性を調査した。ペプチドをトリプシンもしくはキモトリプシンで処理した後、HPLC で元のペプチドの残存率を評価した。**2^{^i}** はどちらの酵素で処理した場合も最も長い半減期を示した。すなわち架橋により、酵素耐性が向上することが分かった (表 1)。

N 末端を TG で修飾したペプチド（ペプチド名の接頭に“TG-”をつけて表す）を用いて、その細胞内挙動を解析した。終濃度が 1 μM になるように各ペプチドを添加した液体培地で HeLa 細胞を 5 時間培養し、蛍光顕微鏡で観察した。TG-2^{^i} で細胞を処理した際には、細胞内にドットが観測された。そしてそのドットの位置はミトコンドリアを選択的に染色する試薬 Mito-Tracker 由来のドットの位置と重なった（図 3）。この結果から、TG-2^{^i} がミトコンドリアに局在することが示唆された。

Bad は Bcl-X_L に結合することでミトコンドリアからのシトクロム C の放出を促進し、カスパーゼを活性化してアポトーシスを誘導する。そこで以下の実験を行い、ペプチドのアポトーシス誘導能とその作用機序について調べた。

a) シトクロム C の放出：各ペプチドで細胞を処理した後、破碎・遠心操作によってミトコンドリア分画と細胞質分画にわけ、ウエスタンブロットを行った。2^{^i} で処理したとき、細胞質分画にシトクロム C の濃いバンドがみられた（図 4）。

b) カスパーゼ 3/7 活性：ペプチド 2^{^i} および 2 で細胞を処理したとき、濃度依存的にカスパーゼ 3/7 の活性が上昇し、ペプチド濃度が 10 μM のときのカスパーゼ活性は、それぞれ 0.1 μM のときの 2.3 倍、1.5 倍となった（図 5）。

c) 細胞生存率：ペプチド 2^{^i} および 2 で細胞を処理したとき、濃度依存的に生存率が低下し、10 μM のときの細胞生存率は、それぞれ 30%、80% であった（図 6）。

d) アネキシン染色：アネキシンを用いて、アポトーシス細胞を選択的に染色した。10 μM の 2^{^i} で細胞を処理したとき、約 70% の HeLa 細胞が染色された（図 7）。

以上の a) ～ d) の実験より、2^{^i} によってアポトーシスによる細胞死のみが誘導されることがわかった。またその活性化経路は Bad と同じであることが示唆された。

2. C 末端に D-Ala を連結した架橋ヘリカルペプチドの開発²⁾

上記で述べた通り、PPI を阻害する架橋ヘリカルペプチド 2^{^i} の開発に成功した。しかし、開発したペプチドは Bcl-X_L と nM オーダーの強さで相互作用するものの、効率よく細胞のアポトーシスを誘導するためには μM オーダーの濃度のペプチドを培地に添加する必要がある。この原因の一つとして、ペプチドの酵素耐性が十分ではなく、細胞内の酵素で分解されてしまった可能性が考えられる。ペプチドの酵素耐性を向上させる方法として、配列中のアミノ酸残基を D アミノ酸に置換する手法がある。しかし架橋ヘリカルペプチド配列中のアミノ酸の一部をこれらのアミノ酸に置換すると、ペプチドのヘリックス形成が阻害されてしまう恐れがある。そこで申請者は、D アミノ酸で L アミノ酸を置換するのではなく、D アミノ酸を配列の末端に取り付けることで元のヘリックス構造に与える影響を最小限にすることができると考えた。すなわち、配列の末端へ D アミノ酸を取り付けることで、ペプチドを末端から分解するエキソペプチダーゼに対する耐性の獲得を期待した。2^{^i} は N 末端にすでに人工の架橋部位を有しており、C 末端がより分解を受けやすいと考えて C 末端に D アミノ酸を取り付けることにした。D アミノ酸としては、D-Ala を選択した。D-Ala は最も単純な D アミノ酸であり、側鎖に電荷をもたないため、導入により Bcl-X_L との結合に与える影響が少ないと考えた。また、取り付ける D アミノ酸の数による影響を調べ

るために、D-Ala を 1-5 残基取り付けたペプチドを合成することにした（表 2）。以後 **2^{hi}** を **D0** と表記し、取り付けた D-Ala 数により **D1**、**D2**・・・と表記する。また、参照として L-Ala を 3 残基取り付けたペプチド **L3** も合成し、比較評価した。

合成した架橋ヘリカルペプチドの CD を測定した。どのペプチドも典型的な α -ヘリックス構造をとり、**D0** と同程度のヘリックス含有率を示した（表 2）。また、表面プラズモン共鳴法を用いて競合実験により相互作用解析を行った。その結果、どのペプチドも **D0** と同程度の強さで相互作用することが分かった（表 2）。

次にペプチドのカルボキシペプチダーゼ Y（CPaseY）耐性を HPLC で評価した。その結果、D-Ala を取り付けたペプチドは **D0** と比較して、8 倍程度長い半減期を示すことが分かった（図 8、表 2）。しかし、この実験は元のペプチドの残存量を追跡するため、親ペプチドから 1 残基アミノ酸が外れる速さを反映することになり、D-Ala の導入数による酵素耐性の違いは確認できなかった。

N 末端を TG でラベル化したペプチドを添加した液体培地で HCT-116 細胞を 5 時間培養した後、蛍光顕微鏡観察を行った。Mito-Tracker 染色により、どのペプチドもミトコンドリアに局在していることが確認された。また、細胞内に観測されたドットの数にはどのペプチドも同程度だった（図 9、青色）。次に、同様の条件で細胞を 5 時間培養し、一旦培地を取り除いた。細胞を数回洗浄して 5 時間経過時点で細胞外に存在するペプチドを取り除き、ペプチドが含まれていない培地を加えた後にさらに 43 時間培養した。顕微鏡観察を行った結果、取り付けた D-Ala 数が多いほど細胞内にドットが多く観測されることが分かった（図 9、赤色）。このことから、D-Ala 数が多いほど相互作用配列部分が分解されにくくなることが示唆された。一方でアネキシン染色実験では、ペプチド **D5** ではなく **D4** が最も高いアポトーシス誘導能を示すことが分かった（図 10）。この理由を探るため、TG ラベル化ペプチドを添加した液体培地で 48 時間細胞を培養した後、細胞内に観測されたすべてのドットの数と、ミトコンドリアに共局在しているドット数をそれぞれ計測した（図 11）。その結果、ドットの総数は **D5** が最も多かったものの、ミトコンドリアに共局在しているドットは **D4** が最も多かった。この理由の一つとしては、D-Ala を導入し過ぎることでペプチドのエンドソームからの脱出効率が低下する可能性が考えられる。

以上より、Bad と Bcl-X_L 間の相互作用を阻害する架橋ヘリカルペプチドの開発に成功した。さらに、架橋ヘリカルペプチドに D アミノ酸を導入することで、結合能を低下させずに酵素耐性を向上させることに成功した。今後は、他のタンパク間相互作用を標的とした架橋ヘリカルペプチドを作成し、この手法の一般化を目指す。

参考文献

- 1) K. Nogami, K. Takahama, A. Okushima, T. Oyoshi, K. Fujimoto and M. Inouye, *ChemBioChem*, 2014, **15**, 2571.
- 2) K. Nogami, H. Tokumaru, G. Isokawa, T. Oyoshi, K. Fujimoto and M. Inouye, *Chem. Commun.*, 2017, **53**, 12104.

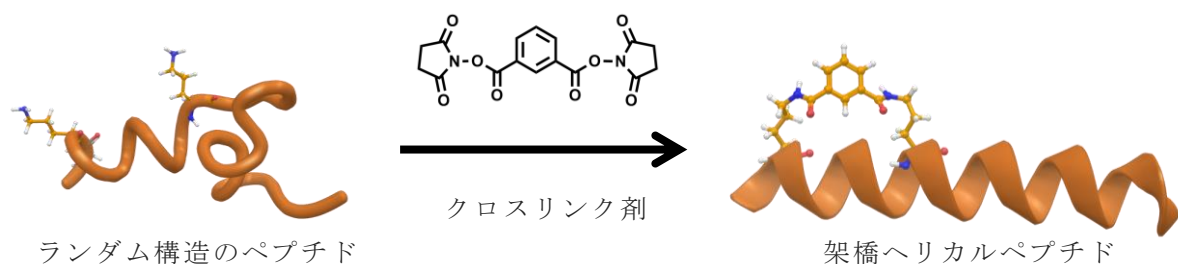


図 1 架橋による α -ヘリックス構造の安定化

ペプチド	配列	ヘリックス含有率 (%)	K_d (nM)	半減期 (min)	
				トリプシン	キモトリプシン
1	NLWAAQRYGRELRRMSDEFVDSFKK Bad の配列を抽出	3	26	1	5
2	NLOrnAAQRYAOrnELRRMSDEFVDSFKK アミノ末端側に Orn を導入	20	42	3	11
2 ^{△i}	NLOrnAAQRYAOrnELRRMSDEFVDSFKK Orn 間を架橋	70	7	10	130
3 ^{△i}	NLOrnAAQRYAOrnELDRMSDEFVDSFKK	50	>120	—	—

表 1 ペプチド配列：2^{△i} および 3^{△i} の Orn 間はイソフタル酸クロスリンク剤で架橋している

ヘリックス含有率：図 2 から算出した

K_d ：10 nM の TG ラベル化ペプチドに対して Bcl-X_L を添加していき、蛍光の偏光度の変化を Bcl-X_L 濃度に対してプロットして算出した

酵素存在下における半減期：各ペプチド (50 μ M) をトリプシンもしくはキモトリプシン (50 nM) と混合した後、一定時間ごとに 2% TFA 水溶液を加えて反応を停止し、残存ペプチド量を HPLC で評価した

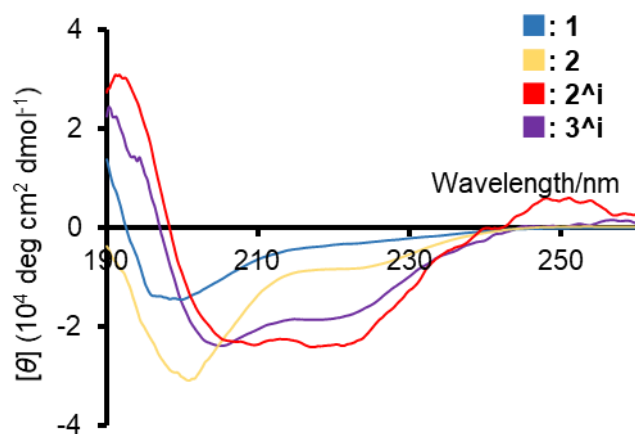


図 2 ペプチド 1、2、2^{△i}、3^{△i} の CD スペクトル

リン酸バッファー pH 6.5、光路長：1 mm、温度：5 $^{\circ}$ C

図 3、図 4 は参考文献 1 を参照せよ

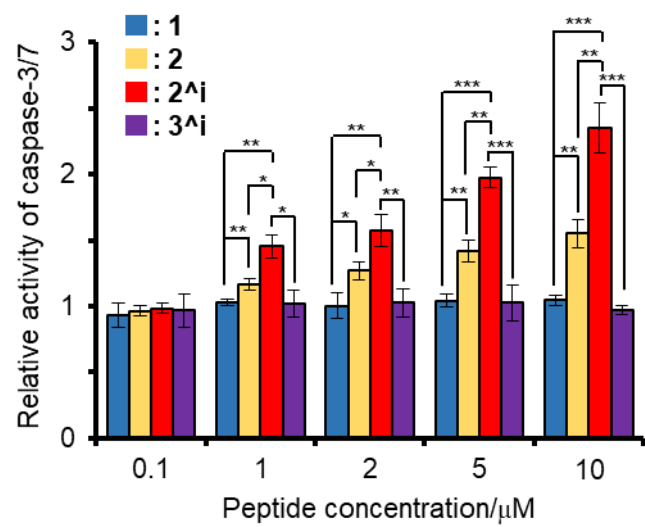


図 5 カスパーゼ 3/7 の活性化
各ペプチド (0.1–10 μM) を含む液体培地で HeLa 細胞を 48 時間培養した後、
Apo-ONE Homogeneous Caspase-3/7 Assay Kit を用いて解析した
***P ≤ 0.001 < **P ≤ 0.01 < *P ≤ 0.05

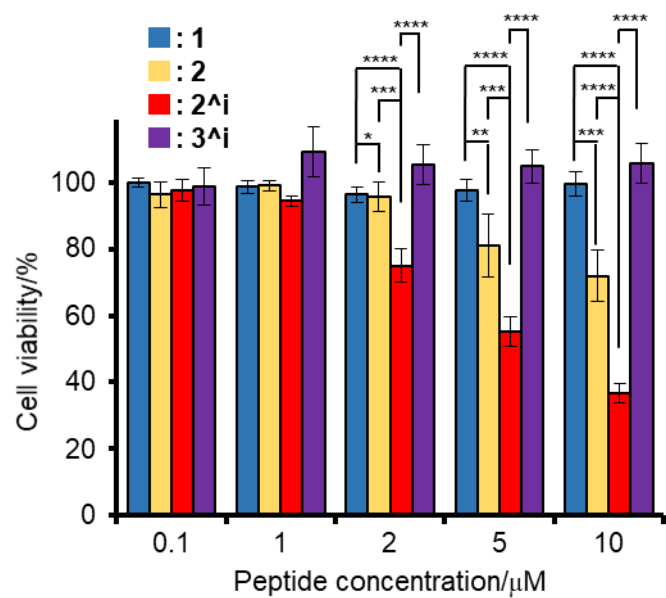


図 6 細胞生存率
各ペプチド (0.1–10 μM) を含む液体培地で HeLa 細胞を 48 時間培養した後、
CellTiter-Glo luminescent kit を用いて解析した
****P ≤ 0.001 < ***P ≤ 0.01 < **P ≤ 0.05 < *P

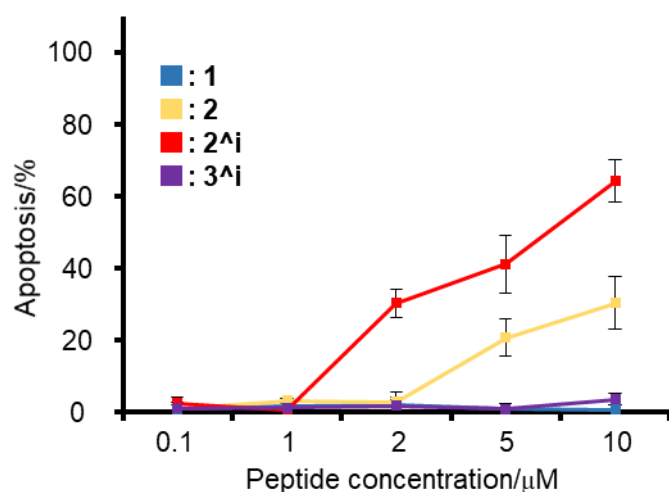


図 7 アネキシン染色

各ペプチド (0.1–10 μM) を含む液体培地で HeLa 細胞を 48 時間培養した後、Annexin-V-FLUOS Staining Kit を用いて解析した

ペプチド	配列	ヘリックス含有率 (%)	IC ₅₀ (nM)	半減期 (h) CPaseY
D0	NLOrnAAQRYAOrnELRRMSDEFVDSFKK	57±7.3	1.86±0.14	1.3
D1	NLOrnAAQRYAOrnELRRMSDEFVDSFKKa	64±10	2.09±0.49	10
D2	NLOrnAAQRYAOrnELRRMSDEFVDSFKKaa	53±1.7	2.14±0.06	10
D3	NLOrnAAQRYAOrnELRRMSDEFVDSFKKaaa	59±6.0	1.94±0.03	12
D4	NLOrnAAQRYAOrnELRRMSDEFVDSFKKaaaa	50±2.1	2.09±0.39	12
D5	NLOrnAAQRYAOrnELRRMSDEFVDSFKKaaaaa	56±6.6	2.23±0.11	12
L3	NLOrnAAQRYAOrnELRRMSDEFVDSFKKAAA	70±1.2	2.14±0.13	0.18

表 2 ペプチドの配列：D アミノ酸は小文字で示している

ヘリックス含有率：リン酸バッファー pH 6.5、光路長 1 mm、温度 25 °C の条件で CD を測定し、算出した

IC₅₀: 10 nM の Bcl-X_L と 0.02–200 nM のペプチドを当量混合して一定時間インキュベートした後、各濃度の溶液を D0 が固定化されたセンサーチップに流して IC₅₀ を算出した

CPaseY 存在下における半減期：図 8 から算出した

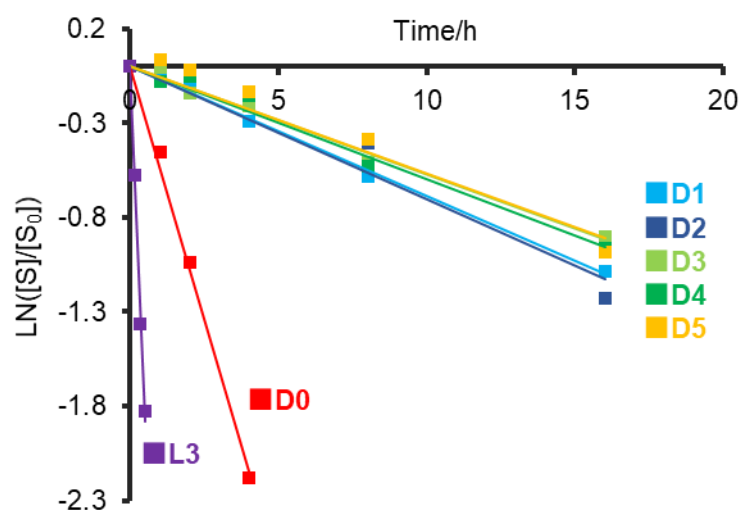


図 8 カルボキシペプチダーゼ耐性

ペプチド 30 μM 、CPaseY 1 μM の条件で酵素反応を行い、一定時間ごとに 2% TFA 水溶液を加えて反応を停止してペプチド残存量を HPLC で評価した

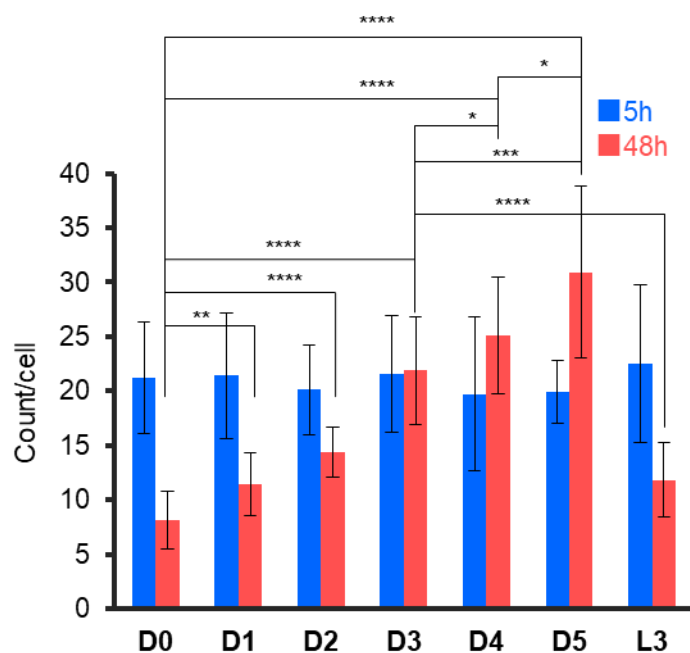


図 9 各ペプチドの細胞内ドット数

青色：TG ラベル化ペプチドを 1 μM となるように添加した液体培地で HCT-116 細胞を 5 時間培養した後、細胞内ドット数を観察した

橙色：細胞培養 5 時間の時点でペプチドを含まない培地に交換し、追加で 43 時間培養した後（合計 48 時間）細胞内ドット数を観察した

**** $P \leq 0.001$ < *** $P \leq 0.01$ < ** $P \leq 0.05$ < * P

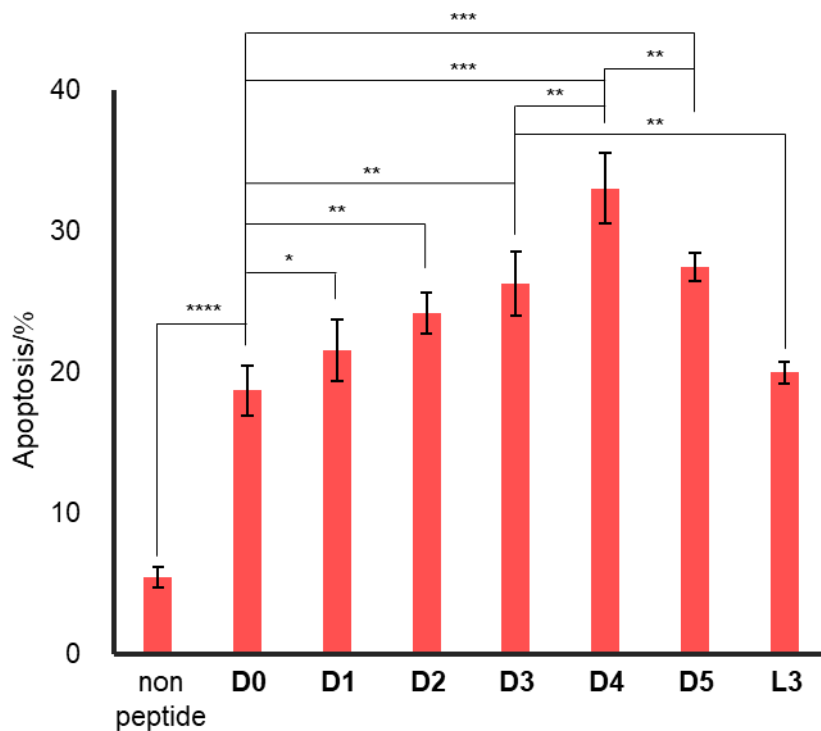


図 10 各ペプチドのアポトーシス誘導能
 終濃度が 10 μM となるように各ペプチドを添加した液体培地で HCT-116 細胞を 48 時間培養し、Annexin-V-FLUOS Staining Kit を用いてアポトーシス細胞を染色した
 **** $P \leq 0.001$ < *** $P \leq 0.01$ < ** $P \leq 0.05$ < * P

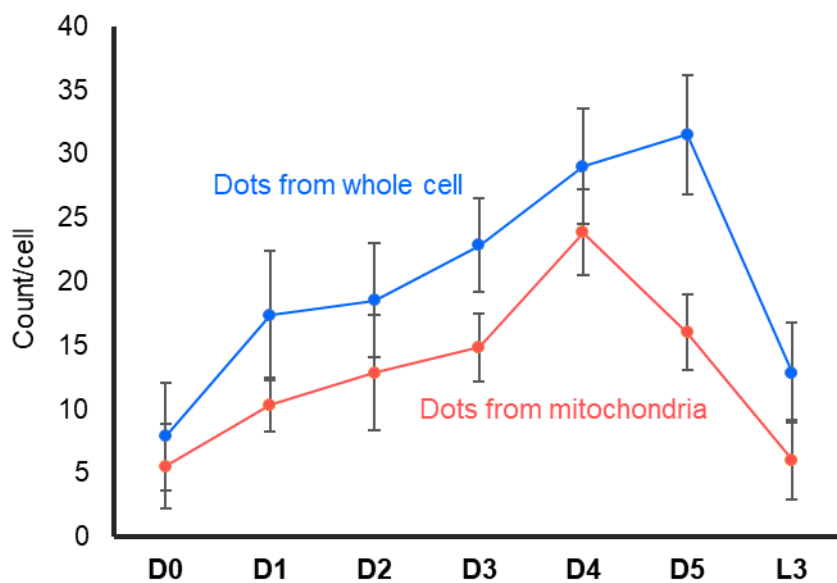


図 11 細胞全体でのドット数およびミトコンドリアに局在しているペプチド由来のドット数の比較
 TG ラベル化したペプチド (1 μM) を含んだ液体培地で HCT-116 細胞を 48 時間培養した後、各ドット数をカウントした

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

タンパク-タンパク間相互作用は、様々な生物学的プロセスに関与している。近年、高次構造が固定化されたペプチドが、細胞内のタンパク間相互作用を制御し得る化合物として注目されている。学位申請者は、ペプチドの側鎖間を化学的に架橋する手法を用いて、アポトーシス促進タンパクの配列を基に、安定な α -ヘリックス構造をとるペプチド“架橋ヘリカルペプチド”を構築した。このペプチドは、元のタンパクの機能を再現して細胞のアポトーシスを誘導した。さらに、この架橋ヘリカルペプチドの C 末端に D-Ala を導入することで、ペプチドの酵素耐性および細胞内安定性を向上させた。本論文の審査内容は以下の通りである。

1. Bad と Bcl-X_L 間の相互作用を阻害する架橋ヘリカルペプチドの開発

第一章では、ミトコンドリアに局在する抗アポトーシスタンパク Bcl-X_L と結合する架橋ヘリカルペプチドの開発を行った。Bcl-X_L と結合するタンパク Bad の相互作用部位を基に様々な架橋ヘリカルペプチドを設計・合成し、CD スペクトルを測定してその高次構造を評価した。その結果、N 末端側をイソフタル酸骨格のクロスリンク剤で架橋したペプチドが安定な α -ヘリックス構造をとることを見出した。in vitro での実験から、このペプチドは非架橋のペプチドよりも強く Bcl-X_L と相互作用することが分かった。また架橋ヘリカルペプチドは、トリプシンなどのエンドペプチダーゼ存在下で、非架橋のペプチドよりも長い半減期を示すことが分かった。

N 末端を蛍光分子で修飾したペプチドを用いて、その細胞内挙動を解析した。各ペプチドを添加した液体培地で細胞を培養した後、蛍光顕微鏡で観察した。架橋ヘリカルペプチドを添加した場合に、細胞内にドットが多数観測され、そのドットの位置はミトコンドリアを選択的に染色する Mito-Tracker 由来のドットの位置と重なった。この結果から、架橋ヘリカルペプチドがミトコンドリアに局在することが示唆された。

架橋ヘリカルペプチドのアポトーシス誘導能とその作用機序について調べた。架橋ヘリカルペプチドの添加により、ミトコンドリアからシトクロム C が放出され、カスパーゼ 3/7 の活性が向上し、細胞生存率が低下することがわかった。さらに、その細胞死はほぼすべてアポトーシスによるものであることが分かった。この機序は元のタンパク Bad と同様のものであることから、架橋ヘリカルペプチドを用いて元のタンパクの機能を再現することに成功したと判断した。

2. C 末端に D-Ala を連結した架橋ヘリカルペプチドの開発

第二章では、第一章で開発した架橋ヘリカルペプチドの酵素耐性および細胞内安定性を向上させる取り組みを行った。具体的には、架橋ヘリカルペプチドの末端に D-Ala を取り

付け、エキソペプチダーゼ耐性の獲得を志向した。第一章で開発した架橋ヘリカルペプチドは N 末端にすでに人工の架橋部位を有しているため、C 末端に D-Ala を取り付けた。取り付ける D-Ala 数による影響を調べるために、D-Ala を 1-5 残基取り付けたペプチドを合成した。

合成した D-Ala 導入架橋ヘリカルペプチドの CD を測定した結果、どのペプチドも典型的な α -ヘリックス構造をとり、元のペプチドと同程度のヘリックス含有率を示した。次に、Bcl-X_L との相互作用を解析し、どのペプチドも元のペプチドと同程度の強さで相互作用することを確認した。また、各ペプチドのカルボキシペプチダーゼ耐性を評価した結果、D-Ala を導入したペプチドは元のペプチドと比較して、8 倍程度長い半減期を示すことが分かった。

N 末端を蛍光分子でラベル化したペプチドを添加した液体培地で細胞を培養した後、蛍光顕微鏡観察を行った。5 時間培養時点では、D-Ala の導入数に関係なく、各ペプチドは細胞内で同程度の数のドットを示した。次に、同様の条件で細胞を 5 時間培養した後、培地をペプチドが含まれていないものに交換してペプチドの供給を停止した。その後追加で 43 時間培養し、顕微鏡観察を行った。その結果、取り付けた D-Ala 数が多いペプチドほど細胞内にドットが多く観測されることが分かった。一方でアポトーシス誘導能は、D-Ala を 5 残基導入したペプチドではなく 4 残基導入したペプチドが最も高かった。また、蛍光ラベル化ペプチドを用いた実験から、細胞内に観測されるドットの総数は D-Ala を 5 残基導入したペプチドが最も多かったものの、ミトコンドリアに共局在しているドットの数には 4 残基導入したペプチドが最も多いことが分かった。これらの結果から、D-Ala の導入によるペプチドの細胞内安定性増加効果と、D-Ala の導入がペプチドの細胞内挙動へ与える影響とのバランスで、D-Ala を 4 残基導入したペプチドが最も高い効果を示したと考えられる。

以上より、学位申請者は Bad と Bcl-X_L 間の相互作用を阻害する架橋ヘリカルペプチドを開発した。さらに、架橋ヘリカルペプチドに D-Ala を導入することで、結合能を低下させずに酵素耐性および細胞内安定性を向上させることに成功した。

主査及び副査は、学位申請者 野上 暁生 君に面接試験を行うとともに論文内容を綿密に審査し、本論文が博士（薬学）の学位を受けるに値すると判断した。

1. Tailor-Made Designer Helical Peptides that Induce Mitochondrion-Mediated Cell Death without Necrosis

ChemBioChem, **2014**, *15*, 2571–2576.

野上暁生、高濱謙太郎、奥島彩子、大吉崇文、藤本和久、井上将彦

2. Bcl-X_L-Binding Helical Peptides Possessing D-Ala Residues at their C-Termini with the Advantage of Long-lasting Intracellular Stabilities

Chem. Commun., **2017**, 53, 12104–12107.

野上暁生、徳丸裕、磯川剛地、大吉崇文、藤本和久、井上将彦